

ドメインエンジニアリングを活用した第2世代 mRNA 輸送体の創出による革新的タンパク質生産基盤の確立

増田 誠司

(京都大学大学院 生命科学研究所)

研究の目的

医薬品などに使用される有用タンパク質の多くは、翻訳後修飾（糖鎖修飾、ジスルフィド結合、脂質修飾、リン酸化など）が活性に必要なため、動物細胞で生産される。遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーにより製造されるタンパク質、ポリペプチド及びそれらの誘導体並びにそれらを構成成分とする医薬品をバイオ医薬品と呼ぶ。バイオ医薬品には、タンパク質医薬、抗体医薬、核酸医薬、ペプチド医薬等様々な種類の医薬品がある。その中でもタンパク質医薬品の世界市場は、2007年に868億ドルに達し、2013年には1,601億ドル規模になるとも予測されている。

タンパク質医薬品は、従来の医薬品で対応できない疾患領域(ガンや関節リウマチなど)^{1,2)}を得意とする。タンパク質生産の6割は動物細胞のハムスター細胞（特にCHO細胞）が用いられているが、この生産方法は大腸菌や酵母などの微生物に比べて非常に生産コストが高いという問題点がある³⁾。現在、動物細胞による有用タンパク質生産を担うのは、CMV（サイトメガウイルス）などの強力プロモータを用いた発現系であり、mRNAへの転写量を増加させ、タンパク質の生産性を向上させる方法である。しかしウイルスを含め、生物の全ゲノム配列が解読されたことにより、タンパク質の生産効率が更に高いプロモータを生み出すことは期待し難い。また翻訳段階等においても効果的な翻訳のための様々な工夫が行われている⁴⁾。そこでまだ研究途上の動物細胞におけるmRNAの核外輸送機構を促進する系⁵⁾を開発すれば生産性向上の原動力になると考え、発現系の開発を行った（図1）。

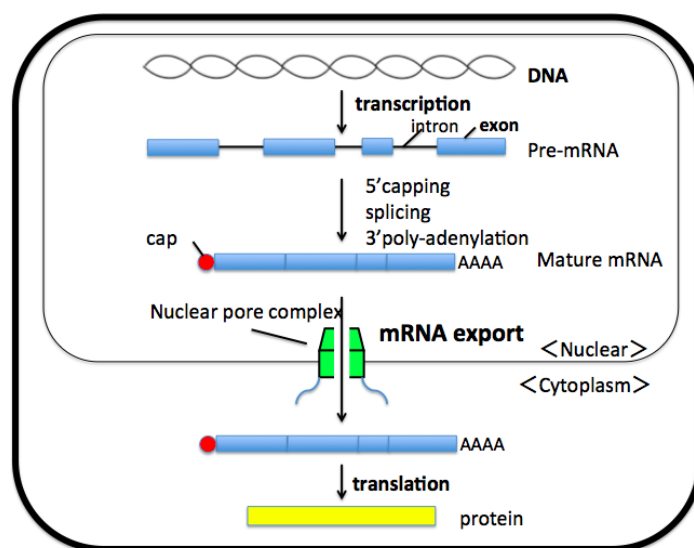


図1 高等真核生物の遺伝子発現

方法

目的タンパク質をコードする mRNA のみに働く専用輸送システムとして MS2 binding site, MS2 タンパク質を用いて新たな発現システムを考案した。Firefly Luciferase 遺伝子の 3'側に MS2 binding site を付加したプラスミドと MS タンパク質の 3'側に mRNA 核外輸送体の Tap を付加したプラスミドを作製した。これらを細胞内で共発現させることにより、MS2 を介して Tap を Firefly Luciferase mRNA に特異的に結合させ、核外輸送を促進する系を構築した(図 2)。

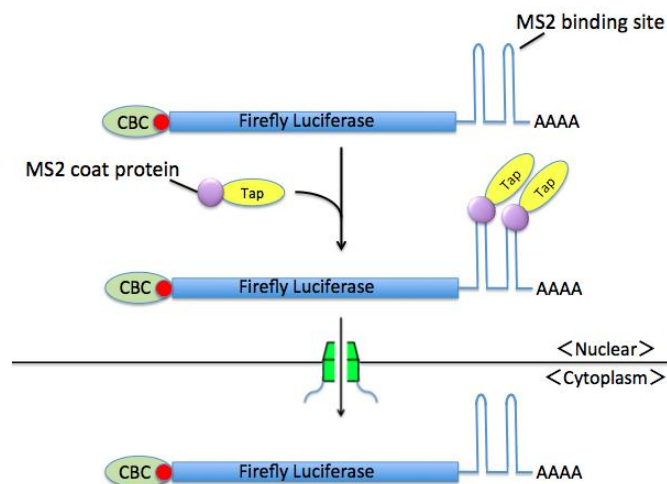


図 2 MS2-Tap による核外輸送促進

12well プレートで培養した CHO 細胞、HeLa 細胞、HEK293 細胞に lipofectamin2000 (Invitrogen) を用いてプロトコールに従って transfection した。その際、遺伝子導入効率の補正として renilla Luciferase を発現する phRL-TK を同時に transfection した。24 時間後の細胞を用いて luciferase kit (Promega) に従い、酵素活性を計測した。

結果

MS2 binding site と MS2 タンパク質-Tap を共発現させると、しなかった場合に比べて Firefly Luciferase 活性が上昇した。具体的には、HeLa 細胞においては約 5.2 倍増加した。HEK293 細胞において約 2.5 倍増加した。CHO 細胞において約 2.5 倍増加した。よって、3 種の異なる細胞において効果を示した。この結果より、MS2 binding site, MS2 タンパク質を用いたタンパク質生産システムは試したすべての細胞において Firefly Luciferase の発現量を高めることができた。ただし細胞ごとに誘導倍率に変動があった。また、MS2 binding site の数を変えると Firefly Luciferase の発現量を増強する効果は変動したものの対照群に比べて活性の上昇が見られた。

結論

活性を測定したヒト細胞と CHO 細胞においてルシフェラーゼの活性上昇効果が観察できた。このことから動物細胞によるタンパク質生産に使用されている細胞において効果がある事を観察した。したがって、mRNA の核外輸送を促進する方法論は動物細胞におけるタンパク質の生産を向上させる効果のある事が明らかになった。今後、より最適な組み合わせを細

胞ごとに構築することで、タンパク質の生産性を向上させることができると考えられる。

文献

- 1) Stebbing J, Copson E and O'Reilly S (2000) Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rev* 26:287-90.
- 2) Neri P, Lettieri M, Fortuna C, Zucchi M, Manoni M, Celani S and Giovannini A (2010) Adalimumab (humira) in ophthalmology: a review of the literature. *Middle East Afr J Ophthalmol* 17:290-6.
- 3) Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:1393-8.
- 4) Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-48.
- 5) Aihara Y, Fujiwara N, Yamazaki T, Kambe T, Nagao M, Hirose Y and Masuda S (2011) Enhancing recombinant protein production in human cell lines with a constitutive transport element and mRNA export proteins. *J Biotechnol* 153:86-91.